



Xilogravura germânica de um típico jardim medieval de plantas medicinais. (in "The Garden of Health," Antuérpia (1533), reproduzido em *Witchcraft Medicine*, Claudia Muller-Ebeling *et al.*, 2003)

Miguel Coleta

Caracterização fitoquímica e neurofarmacológica de plantas usadas na medicina tradicional pelas suas propriedades sedativas

Dissertação de Doutoramento em Farmácia na especialidade de Farmacognosia e Fitoquímica, orientada pela Prof.^a Doutora Maria da Graça Campos e co-orientada pela Prof.^a Doutora Maria Dulce Cotrim, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Janeiro de 2008



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Este trabalho é dedicado aos meus pais pois sem eles nunca poderia ter corrido atrás dos meus sonhos e à Ana Teresa, à Ana Beatriz e ao João Afonso cujos sonhos eu espero ajudar a perseguir.

Agradecimentos	1
Publicações e comunicações no âmbito deste trabalho	3
Objectivos do trabalho	7
Dados de interesse para a realização deste estudo	
Medicina tradicional	13
O desenvolvimento de novos fármacos a partir das plantas	14
Regulamentação e interesse crescente	16
Ansiedade, benzodiazepinas e a pesquisa de alternativas na natureza	16
Aspectos fitoquímicos e farmacológicos das plantas com acção no SNC	19
Flavonóides, ansiedade, o receptor GABA e modelos experimentais	21
Cap. 1 – Estudos fitoquímicos	
1. Introdução	25
1.1. Metabolitos secundários: diversidade e função	25
1.2. Plantas com acção no SNC: evolução e diversidade	27
2. Plantas usadas pelas suas propriedades ansiolíticas / sedativas	
2.1. <i>Hypericum perforatum</i> L.	
2.1.1. Descrição botânica	33
2.1.2. Principais constituintes químicos	34
2.2. <i>Tilia x europaea</i> L.	
2.2.1. Descrição botânica	45
2.2.2. Principais constituintes químicos	46
2.3. <i>Melissa officinalis</i> L.	
2.3.1. Descrição botânica	47
2.3.2. Principais Constituintes Químicos	48
2.4. <i>Passiflora edulis</i> Sims	
2.4.1. Descrição botânica	52
2.4.2. Principais Constituintes Químicos	53
3. Material e Métodos	
3.1. Equipamento	57
3.2. Reagentes e Padrões	57

3.3. Material vegetal	58
3.4. Preparação das infusões e seus liofilizados	58
3.4.1. Determinação do perfil cromatográfico das infusões	58
3.4.2. Determinação do resíduo seco das infusões	59
3.4.3. Doseamento dos flavonóides no liofilizado dos infusos	59
3.5. Análise fitoquímica do <i>Hypericum perforatum</i> L.	60
3.5.1. Avaliação preliminar dos principais constituintes presentes no infuso liofilizado de <i>Hypericum perforatum</i> L. submetido a “screening” farmacológico	60
3.5.2. Isolamento da hiperforina	61
3.5.3. Preparação de extractos etanólicos de <i>Hypericum perforatum</i> L.	62
3.5.4. Evolução do teor dos constituintes ao longo do ciclo de vida da planta	63
3.5.5. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)	64
3.5.6. Doseamento dos principais constituintes de <i>Hypericum perforatum</i> L.	
3.5.6.1. Doseamento por HPLC	65
3.5.6.2. Doseamento colorimétrico das hipericinas totais	65
3.5.7. Distribuição dos principais constituintes nas diferentes partes aéreas do <i>Hypericum perforatum</i> L.	66
3.6. Análise fitoquímica da <i>Passiflora edulis</i> Sims	
3.6.1. Extracção e fraccionamento dos flavonóides presentes nas infusões de <i>Passiflora edulis</i> Sims	
3.6.1.1. Preparação das infusões	66
3.6.1.2. Extracção dos derivados flavonóides	67
3.6.1.3. Subfraccionamento da fracção flavonóide total	68
3.6.2. Isolamento dos constituintes das subfracções	69
3.6.2.1. Procedimentos de extracção alternativos com vista ao isolamento dos compostos SF IA e SF IB	70
3.6.3. Extracção da <i>Passiflora edulis</i> Sims com diferentes solventes	71
3.6.4. Procedimentos analíticos usados no estudo dos derivados flavonóides da <i>Passiflora edulis</i> Sims	
3.6.4.1. Controlo dos processos extractivos	72
3.6.4.2. Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)	72
3.6.4.3. Identificação dos constituintes por HPLC	73
3.6.4.4. Doseamentos por HPLC	73
3.6.5. Análise da estrutura dos constituintes isolados	74
3.6.5.1. Hidrólise ácida pelo método clássico	74

3.6.5.2.	Micro-hidrólise ácida em placa	75
3.6.5.3.	Espectros de Ultravioleta	75
3.6.5.4.	Espectros de ressonância magnética nuclear	76
4.	Resultados e Discussão	
4.1.	Caracterização das infusões e dos respectivos liofilizados	79
4.2.	Análise fitoquímica de <i>Hypericum perforatum</i> L.	
4.2.1.	Avaliação preliminar dos principais constituintes presentes na infusão liofilizada de <i>Hypericum perforatum</i> L.	95
4.2.2.	Doseamento colorimétrico das hipericinas totais	97
4.2.3.	Dosagem, isolamento e estabilidade da hiperforina	98
4.2.4.	Doseamento de outros constituintes dos extractos etanólicos de <i>Hypericum perforatum</i> L.	102
4.2.5.	Distribuição dos principais constituintes bioactivos nas partes aéreas do <i>Hypericum perforatum</i> L. e ao longo do ciclo vegetativo da planta	103
4.2.6.	Preparação de extractos etanólicos de <i>Hypericum perforatum</i> L.	112
4.2.7.	Estabilidade da amostra da planta nas condições do laboratório	114
4.3.	Análise fitoquímica da <i>Passiflora edulis</i> Sims	
4.3.1.	Extracção e fraccionamento dos flavonóides presentes nas infusões de <i>Passiflora edulis</i> Sims	119
4.3.1.1.	Preparação das infusões	119
4.3.1.2.	Extracção dos derivados flavonóides	119
4.3.1.3.	Subfraccionamento da fracção flavonóide total	124
4.3.2.	Isolamento dos constituintes das subfracções	126
4.3.2.1.	Procedimentos de extracção alternativos com vista ao isolamento dos compostos SF IA e SF IB	129
4.3.3.	Extracção da <i>Passiflora edulis</i> Sims com diferentes solventes	130
4.3.3.1.	Doseamentos por HPLC	131
4.3.4.	Identificação e análise da estrutura dos constituintes isolados	132
4.3.4.1.	Hidrólise ácida dos compostos SF IA e SF IB	134
4.3.4.2.	Espectros de Ultravioleta	135
4.3.4.3.	Espectros de ressonância magnética nuclear	142

Cap. 2 – Bioactividade

1. Introdução	157
2. Actividades farmacológicas descritas e mecanismos de acção propostos	
2.1. <i>Hypericum perforatum</i> L.	158
2.1.1. Mecanismos de acção propostos	159
2.1.1.1. Inibição da actividade enzimática da Monoaminooxidase (MAO) e Catecol- <i>O</i> -metiltransferase (COMT)	160
2.1.1.2. Interação com diferentes tipos de neurotransmissores e receptores	162
2.2. <i>Melissa officinalis</i> L.	176
2.2.1. Actividades farmacológicas descritas e mecanismos propostos	178
2.3. <i>Tilia x europaea</i> L.	182
2.3.1. Actividades farmacológicas descritas e mecanismos propostos	182
2.4. <i>Passiflora edulis</i> Sims	183
2.4.1. Actividade farmacológica e mecanismos de acção propostos	183
3. Estudo bioguiado	
3.1. Introdução	187
3.2. Ensaio <i>in vivo</i> : Algumas questões conceptuais	188
3.3. Ensaio <i>in vivo</i> empregues	
3.3.1. Labirinto elevado em cruz (<i>Elevated plus maze</i>)	193
3.3.2. Ensaio em campo-aberto	198
3.3.3. Teste das esferas (<i>Marble-burying test</i>)	200
3.3.4. Teste do arame e Teste da Chaminé	201
3.4. Estudos <i>in vitro</i> para avaliar a afinidade para os receptores benzodiazepínicos dos extractos e compostos testados <i>in vivo</i>	203
4. Material e Métodos	
4.1. Animais	207
4.2. Procedimentos gerais	207
4.3. Registo e análise dos resultados	208
4.4. Ensaio farmacológicos <i>in vivo</i>	
4.4.1. Labirinto elevado em cruz (<i>Elevated plus-maze</i>)	209
4.4.2. Ensaio em campo aberto (<i>Open-field test</i>)	210
4.4.3. Teste das esferas (<i>Marble burying test</i>)	210
4.4.4. Avaliação da actividade motora	210
4.5. Ensaio farmacológicos <i>in vitro</i>	
4.5.1. Animais	211
4.5.2. Isolamento do córtex cerebral de rato	211

4.5.3. Homogeneização	212
4.5.4. Isolamento das membranas do córtex cerebral de rato	212
4.5.5. Determinação da concentração de proteína segundo o método colorimétrico do biureto	212
4.5.6. Ensaio de ligação do [³ H] flunitrazepam a membranas de córtex cerebral de rato	213
5. Resultados e Discussão	
5.1. Screening neurofarmacológico das diferentes plantas em estudo	
5.1.1. <i>Hypericum perforatum</i> L.	215
5.1.2. <i>Tilia x europaea</i> L.	220
5.1.3. <i>Melissa officinalis</i> L.	222
5.1.4. <i>Passiflora edulis</i> Sims	224
5.2. Avaliação neurofarmacológica dos putativos efeitos ansiolíticos da <i>Passiflora edulis</i> Sims e seus constituintes	231
5.3. Estudos <i>in vitro</i> para avaliar a afinidade para os receptores benzodiazepínicos dos extractos e compostos testados <i>in vivo</i>	239
5.3.1. Afinidade para os receptores benzodiazepínicos dos infusos liofilizados de <i>Passiflora edulis</i> Sims, <i>Tilia x europaea</i> L., <i>Melissa officinalis</i> L. e <i>Hypericum perforatum</i> L.	239
5.3.2. Afinidade para os receptores benzodiazepínicos da <i>Passiflora edulis</i> Sims e respectivos extractos flavonóidicos	240
5.3.3. Avaliação da afinidade de SF IA, SF IB e SF IIIB para o local de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA	242
5.3.4. Avaliação da afinidade da luteolina para o local de ligação das benzodiazepinas no complexo-receptor GABA	243
5.4. Algumas considerações sobre o metabolismo das flavonas	246
Conclusões	253
Resumo	263
Abstract	267
Lista de siglas, abreviaturas e termos ou expressões não traduzidos	271
Referências Bibliográficas	275